

菊薯 (*Smallanthus sonchifolius*) 脱毒快繁的研究

杨旭¹, 姜维梅¹, 丁炳扬²

(1. 浙江大学 生命科学学院, 浙江 杭州 310029; 2. 温州师范学院 生命与环境科学学院, 浙江 温州 325027)

摘要: 采用菊薯块茎的腋芽进行生长点的剥离, 通过组织培养得到了再生植株. 经双抗体夹心酶联 (DAS-ELISA) 法对脱毒植株进行病毒鉴定表明, 脱毒的成功率为 60%. 用无毒苗的茎段(含节)、叶片作为外植体, 筛选了从启动、增殖与分化直至生根各阶段的最适培养基, 建立了简单良好的再生体系. 茎段增殖的最适培养基为 MS+BA 1 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹, 愈伤组织诱导的最适培养基为 MS+BA 0.2 mg·L⁻¹+TDZ 0.01 mg·L⁻¹+NAA 0.05 mg·L⁻¹, 最适生根培养基为 1/2MS+NAA 0.01 mg·L⁻¹. 平均移栽成活率达 80% 以上.

关键词: 菊薯; 黄瓜花叶病毒; 离体快繁; 玻璃化

中图分类号: Q943.1 **文献标识码:** A

YANG Xu¹, JIANG Wei-mei¹, DING Bing-yang² (1. College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China; 2. School of Life and Environmental Science, Wenzhou Normal College, Wenzhou, Zhejiang 325027, China)

In vitro propagation of virus-free yacon (*Smallanthus sonchifolius*). Journal of Zhejiang University (Agric. & Life Sci.), 2006, 32(1):51-55

Abstract: The virus-free yacon was got by culturing the meristem-tip from axillary buds of its tuber. The cucumber mosaic virus(CMV) was detected by DAS-ELISA. The results showed that 0.3 mm meristem-tip culture was an effective means for virus elimination and the ratio of virus elimination amount to 60%. A reliable and reproducible method for plant regeneration of yacon was developed which utilizes the stem(with nodes) and leaves from the virus-free plantlet as explants. The optimal proliferating shoot cultures medium from stems was MS supplemented with BAP 1 mg·L⁻¹ and NAA 0.1 mg·L⁻¹. Highly regenerative callus was obtained from the leaves following cultivation on MS medium supplemented with BA 0.2 mg·L⁻¹, TDZ 0.01 mg·L⁻¹ and NAA 0.05 mg·L⁻¹. Regenerated shoots could produce roots in 1/2MS medium containing NAA 0.01 mg·L⁻¹ and the plantlets were successfully transferred to soil, the survival rate being up to 80%.

Key words: *Smallanthus sonchifolius*; cucumber mosaic virus(CMV); *in vitro* propagation; vitrification

菊薯 (*Smallanthus sonchifolius* syn. *Polymnia sonchifolia*), 菊科植物. 原产于南美洲 安地斯山脉, 分布于海拔 3200 m 左右的山地, 为当地居民的传统食物. 20 世纪 80 年代传入欧洲

收稿日期: 2004-11-10

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目(M302668).

作者简介: 杨旭(1979—), 浙江建德人, 硕士研究生, 主要从事植物资源的保护和利用方面的研究. 现在中国林科院亚热带林业研究所工作. Tel: 0571-63100410; E-mail: yx2119@sina.com.

通讯作者: 姜维梅, 女, 硕士, 讲师, 从事植物组织培养及转基因的研究. Tel: 0571-86971373; E-mail: wmjiang@zju.edu.cn.

和日本,受到广泛的关注和应用.在日本,其种植面积达到 100 hm².其根茎含有大量的呋喃果聚糖^[1,2],热量很低,适合糖尿病和肥胖人群食用^[3],能够调整肠道内的微生物的组成和功能,并能促进矿物质特别是钙的吸收,因此是一种良好的糖类替代品.它的叶子脱水后可以作为保健茶.因此近年来在国外受到广泛的关注.

在菊薯的繁殖方面仍存在着很多问题.它的结实能力很低,所结的种子经常不育^[4],难以萌发^[5],因此生产上常以块根进行繁殖.连续多代营养繁殖,容易造成病毒病的积累,导致产量和品质下降.目前已报道侵染菊薯的病毒主要有黄瓜花叶病毒^[5].此外,菊薯还因根结线虫病害造成产量降低,而使用无病害的种质,其产量可以提高 30%^[6,7].组织培养,尤其是利用茎尖分生组织进行的离体快繁,可以脱除植物病毒及其他病原^[8],对种质的复壮有极大的意义.

对于菊薯的组织培养,国外学者有过较多的报道.如 Hamanda 和 Silva 对其腋芽增殖的研究^[9,10];Santarém 对叶片诱导体细胞胚胎的研究^[11]等.我国的相关报道较少,仅见曾慎对其离体快繁做了粗略的研究^[12].本文选用菊薯的茎尖进行脱毒,再以无病毒苗的茎段和叶片作为外植体,对其启动、诱导、生根、移栽过程进行了系统的研究,建立了快速高效的离体快繁体系,以适应工厂化生产的需要.

1 材料与方 法

1.1 材 料

菊薯块茎由日本同行赠送.

1.2 茎尖生长点的剥离

将块茎置于细沙中在人工气候室(25±2)℃中催芽培养 7~10 d.待培育的芽长至 1~2 cm 时,选用腋芽作为外植体.流水冲洗 30 min 后,用 70% 的酒精浸泡 30 s,再用 0.1% 的升汞(内加 2~3 滴吐温 T-20)消毒 8 min,无菌水冲洗 3~5 次后用于茎尖生长点的剥离.

1.3 茎尖生长点愈伤的诱导和芽的再生

将 0.3 mm 大小的茎尖分生组织接种到 MS 培养基上,附加 BA 2 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹.

1.4 再生植株叶片病毒的检测

采用双抗体夹心酶联免疫吸附(DAS-ELISA)法进行检测.反应结果用连续波长生物测读仪于 405 nm 处读取 OD 值.阳性对照采用确定含 CMV 烟草新鲜叶组织;阴性对照采用健康烟草.样品 OD₄₀₅ 值/阴性对照 OD₄₀₅ 值明显 ≥ 2, 判为阳性,样品 OD₄₀₅ 值/阴性对照 OD₄₀₅ 值明显 < 2, 判为阴性.各样品的 OD₄₀₅ 值用 SPSS 数据处理系统进行分析.

1.5 脱毒苗茎段的增殖培养

茎段接种到添加有 0.1~2 mg·L⁻¹ BA+0.01~0.2 mg·L⁻¹ NAA 的 MS 培养基上.

1.6 脱毒苗叶片愈伤的诱导和芽的再生

嫩叶切成 5 mm×5 mm 切块后接种到培养基上.以 MS 作为基本培养基,附加不同浓度 BA、NAA、TDZ 等.

1.7 生 根

当植株生长到 3~4 cm 高时,将其转移到生根培养基上,生根培养基为 MS 或离子浓度减半的 MS,添加不同浓度的 BA 和 NAA.

上述培养基除生根加入 2% 蔗糖外,其余均加入 3% 蔗糖,0.56% 的琼脂,pH5.8.培养条件:温度(25±2)℃,光强 35 μmol·m⁻²·s⁻¹,光照 16 h·d⁻¹的温室中培养.

2 结果与分析

2.1 茎尖分生组织的增殖

由于块茎数量较少,因此培养茎尖分生组织时未作培养基的筛选,参考一般草本植物常使用的激素种类与水平.经过 50 d 的培养,茎尖分生组织形成少量的愈伤组织和较多的从生芽(4~7 个).茎尖分生组织接种的成活率达到 71.42%(10/14),其死亡的主要原因可能是分生组织剥离太小或材料受到解剖针的烫伤.

2.2 再生植株叶片病毒的检测

双抗体夹心酶联的酶标板经酶标仪扫描得到 OD₄₀₅ 值,用 SPSS 数据处理系统进行分析的数据见表 1.

2.3 脱毒苗茎段的增殖

为了迅速扩大无毒苗的数量,我们分别以脱毒苗茎段、叶片作为外植体进行了扩大培养,

表 1 脱毒处理的各样品酶联反应的 OD₄₀₅ 值Table 1 The OD₄₀₅ of DAS-ELISA after eliminating virus

	阳性对照	阴性对照	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
OD ₄₀₅	2.346± 0.219	0.113± 0.002	0.255± 0.0213	0.594± 0.025	0.109± 0.008	0.129± 0.028	0.147± 0.030	0.138± 0.014	0.264± 0.009	0.273± 0.021	0.118± 0.013	0.110± 0.008
样品 OD ₄₀₅ /阴性 OD ₄₀₅			2.25	5.25	0.96	1.14	1.30	1.22	2.34	2.42	1.04	0.97

经 OD 值比对及颜色反应,结果样品 1、2、7、8 未脱除黄瓜花叶病毒,3、4、5、6、9、10 已脱除黄瓜花叶病毒,脱毒的成功率为 60%。

并研究了植物激素的种类、浓度及组合对外植体增殖的影响。

菊薯的茎段在增殖培养基上生长 5 d 后,芽开始出现.大约两周后,在茎段基部就会形成丛生芽(图 1A).当培养基中 NAA 浓度为 0.01 mg·L⁻¹时,BA 的浓度从 0.1 mg·L⁻¹到 2 mg·L⁻¹,菊薯茎段腋芽的增殖差异不显著.当 NAA 浓度为 0.1 mg·L⁻¹时,BA 的浓度从 0.1 mg·L⁻¹升至 2 mg·L⁻¹时,茎段腋芽的增殖差异显著,但 BA 浓度为 2 mg·L⁻¹时,尽管可以形成较多的丛生芽(平均 7.25 个),但形成的芽容易发生玻璃化(18.1%).当 NAA 浓度升至 0.2 mg·L⁻¹时,BA 浓度为 2 mg·L⁻¹时可以形成较多的丛生芽,玻璃化苗的比例也较高(23.6%).因此经 3 次实验重复比较得知茎段腋芽增殖的培养基以 MS + BA 1 mg·L⁻¹ + NAA 0.1 mg·L⁻¹ 生长最为健壮,既可以达到高的增殖倍数,又能保证试管苗的健壮(表 2).

表 2 不同浓度 BA 和 NAA 对茎段腋芽增殖的影响(培养 14 d)

Table 2 Effect of different combinations of BA and NAA on axillary buds proliferation (14 days culture)

处理/(mg·L ⁻¹)	增殖倍数	玻璃化苗的百分率
BA0.1+NAA0.01	1.87±0.23 c	0.00 e
BA1+NAA0.01	2.75±0.45 bc	3.41 d
BA2+NAA0.01	2.85±0.34 bc	10.29 b
BA0.1+NAA0.1	2.00±0.38 c	1.42 d
BA1+NAA0.1	4.61±0.52 b	3.16 d
BA2+NAA0.1	7.25±0.81 a	18.16 ab
BA0.1+NAA0.2	3.25±0.45 c	6.02 c
BA1+NAA0.2	3.81±0.83 bc	7.96 c
BA2+NAA0.2	7.00±0.44 a	23.68 a

2.4 叶片愈伤组织的诱导和芽的再生

叶片接种到培养基上大约 1 周后,开始形成白色或淡黄色的愈伤组织,尤其是从叶片的切口

边缘首先出现,并逐步扩大到整个叶片的表面.黄白色的愈伤组织能在各种培养基上成功诱导,愈伤的诱导率接近 100%,各培养基对愈伤组织的形成无差异.当愈伤组织在培养基上生长一个月后,陆续有丛生芽从愈伤组织上分化形成(图 1B).其中在添加 BA 0.2 mg·L⁻¹ + TDZ 0.01 mg·L⁻¹ + NAA 0.05 mg·L⁻¹ 的培养基上愈伤组织的芽分化率最高,达到 85.4%,每块愈伤组织上芽的数目最多达到了 14.33 个;其次在培养基中添加 BA 0.2 mg·L⁻¹ + TDZ 0.01 mg·L⁻¹,愈伤组织的芽分化率达到 78.1%,每块愈伤组织上芽的数目达到了 11.71 个,二者之间差异不显著.由此可见低浓度的 BA 和 TDZ 对愈伤组织分化和芽的诱导具有一定的累加和协同效应,而在培养基中添加 NAA 对愈伤组织的分化影响不大.当培养基中添加较高浓度的 BA(2 mg·L⁻¹)或较高浓度的 TDZ(0.1 mg·L⁻¹)时,愈伤组织芽的分化率降低,达到 40%左右.每块愈伤组织上芽的数目平均为 5.98 个,并且不定芽出了不同程度的玻璃化现象(表 3).

表 3 不同浓度的 BA、TDZ 和 NAA 对叶愈伤诱导和芽再生的影响(培养 30 d)

Table 3 Effect of different combinations of BA, TDZ and NAA on buds regeneration from leaves (30 days culture)

处理/(mg·L ⁻¹)	愈伤组织百分率	愈伤组织分化率	不定芽的数目
BA2+NAA0.05	94.3 a	46.5 bc	3.50±0.38 c
BA2+NAA0.5	87.9 a	38.6 c	4.13±0.71 c
TDZ0.1+NAA0.05	96.1 a	53.8 b	7.29±1.56 b
TDZ0.1+NAA0.5	92.7 a	41.4 c	9.00±1.30 b
BA0.2+TDZ0.01	89.5 a	78.1 a	11.71±0.74 a
BA0.2+TDZ0.1	91.2 a	56.7 b	8.00±1.20 b
BA0.2+TDZ0.01+NAA0.05	93.8 a	85.4 a	14.33±1.26 a

2.5 生根及移栽

将长约 1.5 cm 的植株转移到生根培养基

上,研究了离子浓度(MS,1/2MS)、NAA浓度以及NAA与BA组合对植株生根的影响.结果发现在所设计的各种培养基上,菊薯都容易生根(图1C).通过比较根长与苗的生长状况可以看出1/2MS的效果优于MS,较适宜的生根培养基

为1/2MS+NAA0.01 mg·L⁻¹,它不但能使生根的时间提前,提高生根率,并且能使根健壮.在培养基中添加BA与NAA是为了实现一步成苗,结果可能是由于BA的浓度过高而NAA的浓度太低,故导致生根率降低(表4).

表4 不同浓度的BA和NAA对植株生根的影响

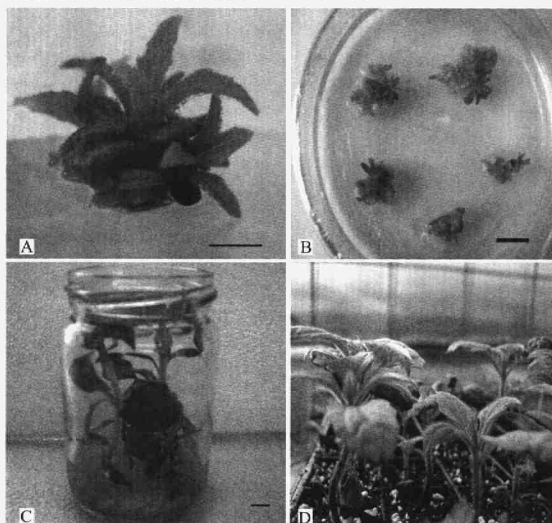
Table 4 Effect of medium, BA and NAA concentrations on rooting of regenerated shoots

培养基/(mg·L ⁻¹)	生根率/%	根长/cm	苗高/cm
MS	0.75±0.07 ab	3.60±0.45 b	2.95±0.18 ab
MS+NAA0.01	0.79±0.04 a	3.81±0.17 ab	2.66±0.22 ab
MS+BA0.1+NAA0.01	0.68±0.09 b	3.86±0.29 ab	2.24±0.12 b
1/2MS	0.80±0.07 a	4.43±0.17 ab	2.87±0.11 ab
1/2MS+NAA0.01	1.00±0.00 a	5.41±0.19 a	3.37±0.16 a
1/2MS+BA0.1+NAA0.01	0.82±0.08 a	4.98±0.29 a	3.67±0.20 a

2.6 驯化与移栽

采用常规炼苗法,将已长根的试管苗移入人工气候室,在自然光下炼苗7~10 d后,打开容器皿盖,让小苗逐渐适应自然条件.3 d后,用清水仔细洗去组培苗根部的培养基,然后将

苗定植于灭过菌的栽培基质中(泥炭土:蛭石:珍珠岩=3:1:1).注意遮荫保湿,尤其是在移栽后10 d内要做到全天遮荫,晴天时注意喷水.约1个月后植株成活,移栽成活率可达80%(图1D).



A:茎段腋芽的增殖; B:愈伤组织的增殖和芽的再生; C:生根的试管苗;
D:移栽成活并生长两个月的小植株. Bar = 1 cm.

图1 菊薯的离体培养

Fig. 1 Propagation system of yacon

3 讨 论

菊薯的脱毒快繁还未见报告,但该种植物的组培报告较多. Hamanda 以 *Polimnia sonchifolia* 的节作为外植体,只研究了 2 种 BA 浓度 ($0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 对其腋芽增殖的影响^[9]. 结果认为在 MS 培养基添加 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA 对节部腋芽的增殖优于无激素处理的. 生根培养基中添加 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 IBA 对提高生根率有较大的帮助. Santarém 报告了以 *Smallanthus sonchifolius* 叶片作为外植体诱导体细胞胚胎的发生,认为较适宜的诱导体细胞胚胎发生的培养基是在 MS 培养基中添加 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA + $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D 或 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D + $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ cinetin^[11]. 在我们的研究中,以节作为外植体, $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA 与 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 组合对节部腋芽的增殖效果较好. 以叶切块 ($0.5 \text{ cm} \times 0.5 \text{ cm}$) 作为外植体,在低浓度的 BA ($0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 与 TDZ ($0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 MS 培养基中可以诱导叶片愈伤组织的形成和芽的高频再生. TDZ 作为一种非嘌呤细胞分裂素类似物显示出比传统细胞分裂素更强的作用,其对腋芽繁殖和不定芽的器官发生都有效. 我们在快繁中避免使用 2,4-D,以防止植株变异的发生. Silva 在实验中发现使用植株茎段上的腋芽作为外植体优于块茎上的芽,因为后者污染率较高^[10]. 我们在实验中,将菊薯的块茎先用 50% 多菌灵液稀释 500 倍浸泡 30 min,然后放在经阳光曝晒的沙中催芽,这样的处理使我们很容易得到了无菌的外植体. 在实验中我们还发现,菊薯继代培养过程中非常容易发生玻璃化,这与 Mogor 在 yacon 的离体快繁中的报道一致. 因此如何控制玻璃化是本实验的关键性问题. 我们发现降低培养基中离子浓度,例如使用离子浓度减半的 MS 培养基以及培养基中不添加肌醇,甚至选用离子浓度更低的 WPM 培养基都可以有效地控制玻璃化. 降低培养基中的细胞分裂素的浓度,继代培养时 BA 使用浓度降至 $0.2 \sim 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,甚至不使用细胞

分裂素,培养时提高容器中的透气性等措施均可有效控制玻璃化苗的出现.

References:

- [1] Asami T, Kubota M, Minamisawa K, et al. Chemical composition of yacon, a new root crop from the Andean Highlands[J]. Soil Sci., 1989, 60:122-126.
- [2] Ohyama T, Ito O, Yasuyoshi S, et al. Composition of storage carbohydrate in tubers of yacon (*Polymnia sonchifolia*) [J]. Soil Sci. Plant Nutr, 1990, 36:167-171.
- [3] Kakiyama T S, Câmara F L A, Vilhena. S M C. Cultivo e industrialização de yacon: uma experiência brasileira. Resumos I Congresso Latino Americano de Raízes Tropicais [J]. CERAT-UNESP, 1996:79-83.
- [4] Grau A. Yacon. A highly productive root crop. New Plants Dossier. Internal Report [M]. Biodiversity Programme, Invermay, New Zealand. 1993.9:3-9.
- [5] Kuroda S, Ishihara J, Field growth characteristics of plantlets propagated *in vitro* and line selection for increased percentage of sugar in tuberous roots of yacon, *Polymnia sonchifolia*. [J]. Bull. Shikoku Nat. Agric. Exp. Sta., 1993, 57:111-121.
- [6] Lizárraga L, Ortega R, Vargas W. Cultivo del yacón (*Polymnia sonchifolia*) [J]. Resúmenes Curso. 1997: 65-71.
- [7] Mogor G, Mogor A F, Lima G P P. Bud source, asepsis and benzylaminopurine (BAP) effect on Yacon (*Polimnia sonchifolia*) micropropagation [J]. ISHS Acta Horticulturae, 2003(597):311-313.
- [8] Hollings M. Disease control through virus-free stock [J]. Annu. Rev. Phytopath., 1965, 3:367-397.
- [9] Hamanda M, Hosoki T, Kusabiraki Y. Mass-propagation of Yacon (*Polimnia sonchifolia*) by repeated node culture [J]. Plant tissue culture, 1990, 7(1):35-37.
- [10] Santarém E R. Embriogênese Somática em Yacon (*Schimnia sonchifolia*) [J/OL]. http:// www.unicruz.tche.br.Rev. Phytopath. 3:367-396.
- [11] ZENG Shen(曾慎). Tissue culture and rapid propagation of *Schimnia sonchifolia* [J]. Plant Physiology Communication(植物生理学通讯), 2004, 40(2): 212-213. (in Chinese)
- [12] Silva M A S, Hidalgo A F. Production of Yacon plantlet (*Polimnia sonchifolia*) in different organic fertilization [J]. ISHS Acta Horticulturae, 2002, 576:285-287.